



⑬ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 195 05 960 A 1**

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**A 61 K 31/28**  
A 61 K 41/00  
A 61 K 45/05

⑳ Aktenzeichen: 195 05 960.3  
㉑ Anmeldetag: 21. 2. 95  
㉒ Offenlegungstag: 22. 8. 96

DE 195 05 960 A 1

㉓ Anmelder:  
Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des  
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE

㉔ Vertreter:  
Müller-Boré & Partner, 81671 München

㉕ Erfinder:  
Sinn, Hannsjörg, Dipl.-Chem. Dr., 69118 Wiesloch,  
DE; Schrenk, Hans-Hermann, 67278 Zeiskam, DE;  
Maier-Borst, Wolfgang, Dipl.-Chem. Dr., 69221  
Dossenheim, DE; Stehle, Gerd, Dr., 68305  
Mannheim, DE

㉖ Entgegenhaltungen:  
DE 41 34 158 A1  
DE 34 04 443 A1

BE 8 98 708 A2  
US 52 92 938 A  
US 51 01 041 A  
US 46 63 277 A  
US 46 34 586 A  
EP 04 97 585 A2  
EP 03 45 723 A2  
EP 02 74 343 A2  
EP 02 43 929 A2  
EP 01 88 256 A2  
EP 01 78 125 A2  
EP 01 74 853 A2  
WO 93 21 957 A1  
WO 93 17 714 A1  
WO 92 18 166 A1  
WO 92 08 494 A1  
WO 89 12 631 A1  
WO 89 11 868 A1  
WO 89 07 456 A1

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉗ Konjugat zur individuellen Dosierung von Arzneimitteln

㉘ Die Erfindung betrifft ein Konjugat mit einem Wirkstoff  
und einer eine Bindungsstelle für Metallverbindungen auf-  
weisenden Verbindung.  
Des weiteren betrifft die Erfindung ein Verfahren zur  
Herstellung eines solchen Konjugats und dessen Verwen-  
dung.

DE 195 05 960 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 06. 96 602 034/586

16/27

Die Erfindung betrifft ein Konjugat zur individuellen Dosierung von Arzneimitteln, Verfahren zur Herstellung eines solchen Konjugats sowie dessen Verwendung.

Seit langem ist es ein großes Bedürfnis, Arzneimittel individuell zu dosieren, d. h. ihre Dosis genau auf den Therapieverlauf bei einem Patienten abzustellen. Dieses Bedürfnis liegt insbesondere bei Verwendung von Chemotherapeutika vor. Viele Versuche wurden unternommen, vorstehendes zu erreichen. Bisher waren allerdings die Versuche nur wenig erfolgreich.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem Arzneimittel individuell dosiert werden können.

Erfindungsgemäß wird dies durch ein Konjugat erreicht, das einen Wirkstoff und eine eine Bindungsstelle für Metallverbindungen aufweisende Verbindung umfaßt.

Der Ausdruck "Wirkstoff" umfaßt Substanzen jeglicher Art, die zur Therapie und/oder Diagnose einer Erkrankung, insbesondere einer Tumorerkrankung, Infektionserkrankung, Hauterkrankung und/oder Erkrankung des Immunsystems, verwendet werden können.

Beispiele solcher Substanzen sind Chemotherapeutika, z. B. Antibiotika, Virostatika, Antipprotozoenmittel und Zytostatika. Beispiele der Antibiotika sind Sulfonamide, Tetracycline, z. B. 7-Chlortetracyclin, Fusidinsäure, Gyrasehemmstoffe, z. B. Chinolone, Amphotericin, Isoniazid, Pyrazin 2-carbonsäure und Pyrazinamid. Beispiele der Virustatika sind Amantadin und Rimantadin. Beispiele von Antipprotozoenmittel sind Mefloquin und Primaquin. Beispiele für Zytostatika sind Anthrazykline, z. B. Doxorubicin, Topoisomerase-Hemmstoffe, Mitomycin A und C, Bleomycinsäure, Chlorambucil, Melfalan und Folsäureantagonisten, z. B. Methotrexat.

Weiterhin kann eine solche Substanz ein Aminoanthrachinon, wie Cellitonblau und Säureschwarz, sein.

Ferner kann eine solche Substanz eine photoaktive Substanz sein, z. B. ein Porphyrin, wie o-, m-, und/oder p-Tetrahydroxyphenylporphin, o-, m- und/oder p-Tetracarboxyphenylporphin und o-, m- und/oder p-Tetrasulfophenylporphin, ein Chlorin, wie o-, m- und/oder p-Tetrahydroxyphenylchlorin, o-, m- und/oder p-Tetracarboxyphenylchlorin und o-, m-, und/oder p-Tetrasulfophenylchlorin, oder ein Bakteriochlorin, o-, m- und/oder p-Tetrahydroxyphenylbakteriochlorin wie o-, m- und/oder p-Tetracarboxyphenylbakteriochlorin und o-, m-, und/oder p-Tetrasulfophenylbakteriochlorin.

Desweiteren kann eine solche Substanz ein Kontrastmittel für die Fluorspektroskopie, z. B. Trifluoressigsäure, Kernspintomographie oder Szintigraphie sein.

Von vorstehenden Substanzen bzw. Analoga oder Derivaten davon liegen ein oder mehrere in einem erfindungsgemäßen Konjugat vor. Bei mehreren, können diese gleich oder verschieden voneinander sein.

Der Ausdruck "Bindungsstelle für Metallverbindungen aufweisende Verbindung" umfaßt Verbindungen jeglicher Art, die Bindungsstellen für Metallverbindungen aufweisen. Beispiele solcher Bindungsstellen sind Hydroxylgruppen, insbesondere an C-Atome gebundene Hydroxylgruppen, Carbonyl- und Carboxylgruppen. Die Verbindung kann eine oder mehrere Bindungsstellen aufweisen. Vorzugsweise hat die Verbindung mindestens 2, besonders bevorzugt 3 bis 6 Bindungsstellen. Liegen mehrere Bindungsstellen vor, so können diese gleich oder verschieden voneinander sein. Beispiele vor-

stehender Verbindungen sind Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Diethylentriaminpentaacetat (DTPA), Triethylentetraminhexaacetat (TTHE), Alizarin und Derivate davon.

Von vorstehenden Verbindungen liegen eine oder mehrere in einem erfindungsgemäßen Konjugat vor. Bei mehreren, können diese gleich oder verschieden voneinander sein. Das Vorliegen mehrerer der vorstehenden Verbindungen begünstigt die Wasserlöslichkeit des Konjugats und seine Fähigkeit, Metallverbindungen zu binden.

In einer bevorzugten Ausführungsform weist ein erfindungsgemäßes Konjugat eine nachweisbare Metallverbindung auf. Eine solche kann ein oder mehrere nachweisbare Metalle und/oder Metallionen enthalten oder aus solchen bestehen. Beispiele solcher Metalle sind Zn, Cu, Co, Fe, Ni, Pt, Gd und In, die vorzugsweise 2- oder 3-wertig sind, wobei  $Gd^{3+}$  besonders bevorzugt ist. Die Metalle und/oder Metallionen können radioaktiv sein, wie  $^{111}In$ .

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weist ein erfindungsgemäßes Konjugat einen Träger auf. Der Ausdruck "Träger" umfaßt Verbindungen jeglicher Art, die zur Anreicherung des Konjugats in einem bestimmten Gewebe, z. B. einem Tumor oder einem Entzündungsherd, geeignet sind. Beispiele solcher Träger sind Proteine, die nicht als körperfremd angesehen werden, und Polyether. Erstere liegen vorzugsweise in nativer Form vor. Ferner weisen sie vorzugsweise ein Molekulargewicht von bis zu 90 000 Dalton auf. Besonders bevorzugt ist das Protein Albumin, insbesondere humanes Serumalbumin (HSA), oder Transferrin. Beispiele von Polyether sind Polyethylenglykole, wie Methoxypolyethylenglykol, Methoxypolyethylenglykol-p-nitrophenylcarbonat, Methoxypolyethylenglykolsuccinimidylsuccinat, Methoxypolyethylenglykoltresylat, Methoxypolyoxyethylenamin, Methoxypolyoxyethylen-carbonsäure und Methoxypolyoxyethylenimidazolcarbonyl. Vorzugsweise weisen die Polyether ein Molekulargewicht von 100 bis 20 000 Dalton, besonders bevorzugt etwa 5000 Dalton auf.

Ein erfindungsgemäßes Konjugat kann einen oder mehrere vorstehender Träger aufweisen. Liegen mehrere Träger vor, können diese gleich oder verschieden voneinander sein.

In einem erfindungsgemäßen Konjugat können ein oder mehrere Wirkstoffe mit einer oder mehreren Verbindungen verbunden sein, die Bindungsstellen für Metallverbindungen aufweisen. Ferner können die Wirkstoffe und/oder die Verbindungen untereinander verbunden sein.

Ein solches Konjugat kann auch eine oder mehrere nachweisbare Metallverbindungen enthalten. Diese können von der Bindung zwischen dem oder den Wirkstoffen und der oder den Verbindungen ausgenommen sein oder diese darstellen.

Ein vorstehendes Konjugat kann ferner einen oder mehrere Träger enthalten. Diese können mit dem oder den Wirkstoffen, der oder den Verbindungen und/oder der oder den Metallverbindungen verbunden sein.

Vorstehende Komponenten des erfindungsgemäßen Konjugats sind als Edukte angegeben. Im Konjugat liegen Sie derivatisiert vor.

Bevorzugte erfindungsgemäße Konjugate sind in den Fig. 1—6 dargestellt.

Erfindungsgemäß wird auch ein Verfahren zur Herstellung eines vorstehenden Konjugats bereitgestellt. In einem solchen Verfahren werden übliche Umsetzungen

der Chemie, wie Aktivierung einer Säuregruppe und Verknüpfung der aktivierten Säuregruppe mit einer Aminogruppe, durchgeführt. Hierzu wird auf die Herstellung der Konjugate in den Beispielen 1 und 2 sowie in den Fig. 1—6 verwiesen.

Erfindungsgemäße Konjugate werden in markierter und unmarkierter Form bereitgestellt. Beide Formen eignen sich gut für therapeutische Zwecke. Günstig ist es, die markierte Form zu verschiedenen Zeiten der Therapie zu verabreichen, wodurch die Aufnahme und Verteilung des erfindungsgemäßen Konjugats im Körper und seine Wirkung bestimmt werden kann. Damit ist es möglich, das Konjugat individuell zu dosieren. Dies stellt einen großen Vorteil dar, der sich insbesondere in der Chemotherapie auswirkt. Durch die individuelle Dosierung des Konjugats können die Nebenwirkungen auf gesundes Gewebe minimiert werden. Dies wird insbesondere erreicht, wenn das erfindungsgemäße Konjugat einen Träger enthält, der eine Anreicherung des Konjugats in bestimmten Geweben, z. B. Tumoren oder Entzündungsherden, bewirkt. Somit ermöglicht die vorliegende Erfindung eine ziel- und dosisgenaue Verabreichung von Arzneimitteln.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1 zeigt die Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugats Novantron-DTPA-HSA,

Fig. 2 zeigt die Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugats Cellitonblau-DTPA-HSA,

Fig. 3 zeigt die Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugats Säureschwarz-DTPA,

Fig. 4 zeigt die Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugats 7-Chlortetrazyclin-Alizarin-HSA,

Fig. 5 zeigt die Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugats Cellitonblau-DTPA-PEG,

Fig. 6 zeigt die Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugats TTHE-PEG(3)-Diethylentriamin(3)-DTPA/Gd<sup>3+</sup> (6), wobei die Zahlen in Klammern die Anzahl der jeweiligen Verbindungen im Konjugat angeben,

Fig. 7 zeigt die Wachstumsinhibition von Tumorzellen durch Verabreichung von Cellitonblau-DTPA-HSA bzw. Novantron-DTPA-HSA,

Fig. 8 zeigt die Wachstumsinhibition von Tumorzellen mit Säureschwarz-DTPA, und

Fig. 9 zeigt die Verteilung von <sup>111</sup>In- Novantron-DTPA-HSA über der Tumor-, Herz- und Leberregion.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

#### Beispiel 1

##### Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugats Novantron-DTPA-HSA

Die Herstellung des Konjugats und seine Struktur sind in Fig. 1 gezeigt.

Novantron wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in 0,17 M Bic gelöst. Zu dieser Lösung wurde portionsweise DTPA-Anhydrid zugegeben, bis dünn-schichtchromatographisch unter Standard-Bedingungen kein freies Novantron mehr nachweisbar war.

DC: Standardbedingungen:

Platten: Kieselgel 60 (5 × 20 cm) ohne Fluoreszenzindikator

Laufmittel: Etac. 70; MeOH 30 (v/v)

Rf. Novantron: 0,58—0,62

Novantron-DTPA: 0,0

Anschließend wurde die Lösung mit 2 N HCl versetzt bis sich ein blauer Niederschlag bildete (etwa bei pH 2). Das so erhaltene Gemisch wurde nachfolgend am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt.

Der nach dem Einengen am Rotationsverdampfer erhaltene Rückstand wurde in DMF gelöst und mit einem zweifachen molaren Überschuß an Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und einem zehnfachen Überschuß an N-Hydroxysuccinimid (HSI) versetzt. Nach etwa 12 Stunden erfolgte die Zugabe von HSA (10 mg/ml in 0,17 M NaHCO<sub>3</sub>). Das Reaktionsgemisch wurde etwa 30 Minuten stehengelassen. Danach wurde in üblicher Weise DCC, DCHH, DMF und HSI abgetrennt. Die Reinheit wurde mittels HPLC und DC überprüft. Es wurde Novantron-DTPA-HSA erhalten.

#### Beispiel 2

##### Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugats Cellitonblau-DTPA-HSA

Die Herstellung des Konjugats und seine Struktur sind in Fig. 2 gezeigt.

Cellitonblau (1,4,5,8-Tetraaminoanthrachinon, FG. 268,28) wurde in einer Konzentration von 20 mg/ml in DMF gelöst. Unter Rühren wurde solange DTPA-Anhydrid zugegeben, bis dünn-schichtchromatographisch kein freies Cellitonblau mehr nachweisbar war.

DC: Standardbedingungen:

Rf. Werte: Cellitonblau: 0,62—0,66

Cellitonblau-DTPA: 0,0

Die Reinigung der blauviolett gefärbten Substanz erfolgte über Ultrafiltration (YC 05), wobei der pH der Lösung auf etwa 6,5 eingestellt wurde. Anschließend wurde die Lösung mit 2 N HCl angesäuert (pH 2,0—2,5) und unmittelbar darauf am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Probe wurde anschließend in Methanol wieder gelöst und erneut am Rotationsverdampfer eingengt, um Restmengen von Wasser zu entfernen. Dies wurde mindestens dreimal durchgeführt. Die Umsetzung des Cellitonblau-DTPA mit DCC und HSI erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben. Nach 12 bis 14 Stunden erfolgte die Umsetzung mit HSA. Nach einer Reaktionszeit von etwa 30 Minuten wurden Begleitstoffe, wie in Beispiel 1 beschrieben, abgetrennt. Die Reinheit wurde mittels DC und HPLC überprüft. Es wurde Cellitonblau-DTPA-HSA erhalten.

#### Beispiel 3

##### Wachstumsinhibition von Tumorzellen durch Verabreichung von Cellitonblau-DTPA-HSA bzw. Novantron-DTPA-HSA

Die Konjugate Cellitonblau-DTPA-HSA und Novantron-DTPA-HSA sowie HSA als Kontrolle wurden jeweils mit Walker-256-Tumorzellen unter üblichen Bedingungen inkubiert. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurde in üblicher Weise die Zellzahl pro ml bestimmt.

Aus Fig. 7 geht hervor, daß jedes der erfindungsgemäßen Konjugate die Proliferation von Tumorzellen inhibiert.

#### Beispiel 4

##### Wachstumsinhibition von Tumorzellen durch

## Verabreichung von Säureschwarz-DTPA

Beispiel 4 wurde wie vorstehendes Beispiel 3 durchgeführt, wobei als Konjugat Säureschwarz-DTPA verabreicht wurde.

Aus Fig. 8 geht hervor, daß das erfindungsgemäße Konjugat die Proliferation von Tumorzellen inhibiert.

## Beispiel 5

Verteilung von  $^{111}\text{In}$ -Novantron-DTPA-HSA über der Tumor-, Herz- und Leberregion

Das erfindungsgemäße Konjugat wurde durch eine intravenöse Injektion einer tumortragenden Ratte (Walker-256 Karzinosarkom) verabreicht. In üblicher Weise wurde szintigraphisch die prozentuale Aufnahme, bezogen auf die Gesamtmenge an verabreichtem Konjugat, gemessen.

Desweiteren wurde vorstehendes Konjugat narkotisierten Ratten verabreicht und in üblicher Weise szintigraphisch die Abnahme des erfindungsgemäßen Konjugats in der Herz- bzw. Leberregion gemessen.

Aus Fig. 9 geht hervor, daß sich das erfindungsgemäße Konjugat im Tumor anreichert, nicht jedoch im Bereich des Herzens oder der Leber.

## Patentansprüche

1. Konjugat, umfassend einen Wirkstoff und eine Bindungsstelle für Metallverbindungen aufweisende Verbindung.
2. Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff eine zur Therapie einer Tumorerkrankung, Infektionserkrankung, Hauterkrankung und/oder Erkrankung des Immunsystems verwendbare Substanz ist.
3. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Wirkstoffe vorliegen.
4. Konjugat nach einem der Ansprüche 1—3, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungsstelle für Metallverbindungen eine Hydroxyl-, Carbonyl- oder Carboxylgruppe ist.
5. Konjugat nach einem der Ansprüche 1—4, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Bindungsstellen vorliegen.
6. Konjugat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß 2—6 Bindungsstellen vorliegen.
7. Konjugat nach einem der Ansprüche 1—6, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung EDTA, DTPA, TTHE, Alizarin oder ein Derivat davon ist.
8. Konjugat nach einem der Ansprüche 1—7, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Verbindungen vorliegen.
9. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Konjugat eine nachweisbare Metallverbindung aufweist.
10. Konjugat nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Metallverbindung ein nachweisbares Metall und/oder Metallion enthält oder aus solchen besteht.
11. Konjugat nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Metall oder Metallion radioaktiv ist.
12. Konjugat nach einem der Ansprüche 1—11, dadurch gekennzeichnet, daß das Konjugat weiterhin einen Träger aufweist.
13. Konjugat nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet,

zeichnet, daß der Träger ein nicht als körperfremd angesehenes, natives Protein oder ein Polyether ist.

14. Konjugat nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein Albumin ist.

15. Konjugat nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Polyether ein Polyethylenglykol oder ein Derivat davon ist.

16. Konjugat nach einem der Ansprüche 12—14, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Träger vorliegen.

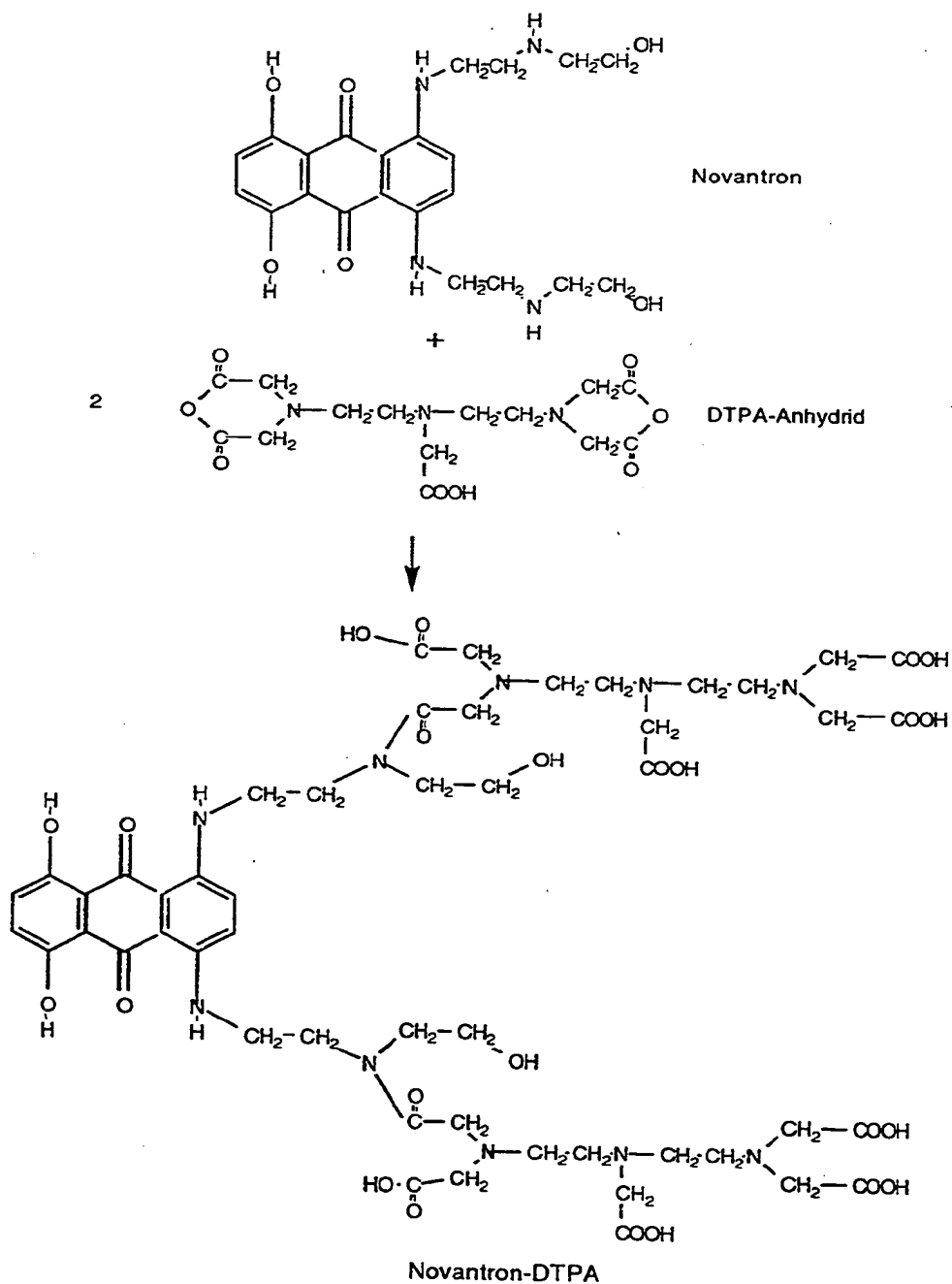
17. Verfahren zur Herstellung eines Konjugats nach Ansprüchen 1—16, dadurch gekennzeichnet, daß ein Wirkstoff mit einer Bindungsstelle für Metallverbindungen aufweisenden Verbindung und ggfs. mit einer nachweisbaren Metallverbindung und/oder einem Träger in üblicher Weise verbunden werden.

18. Verwendung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1—16 zur Therapie und/oder Diagnose einer Erkrankung.

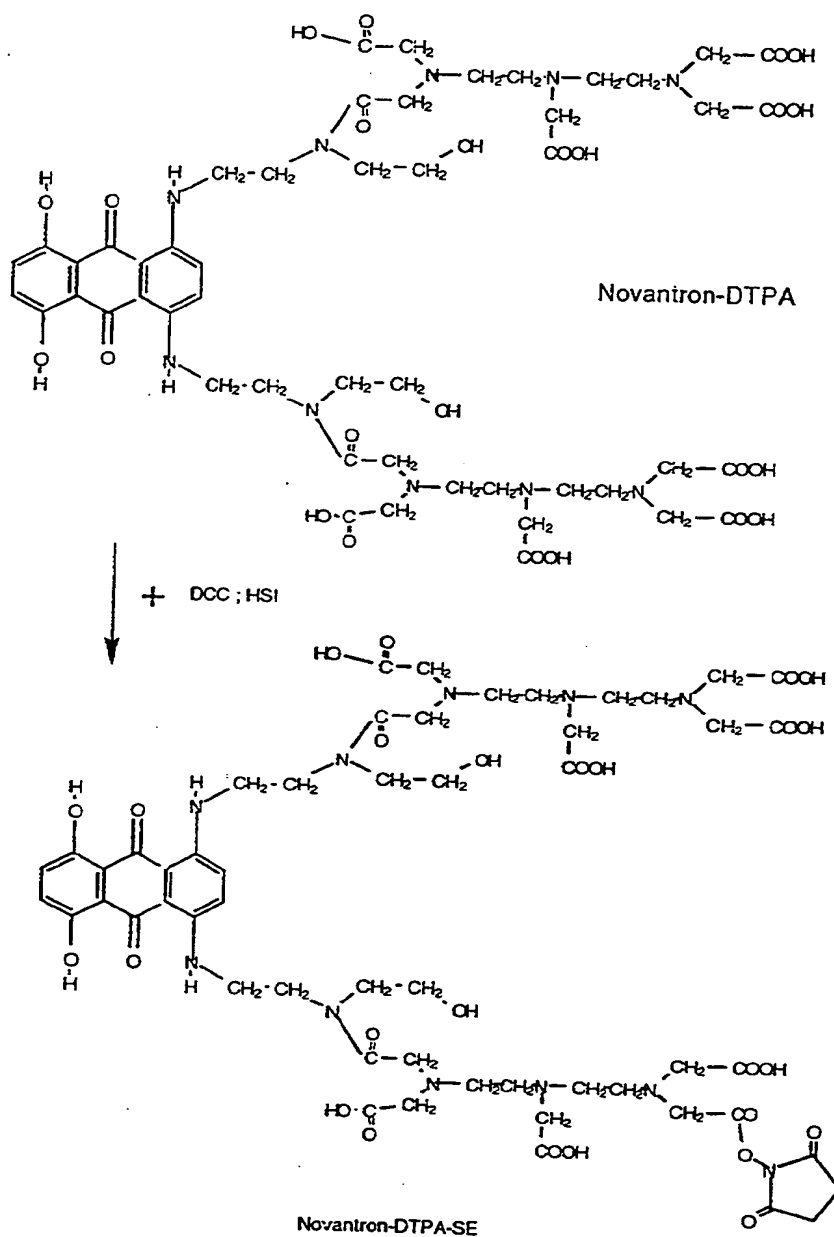
19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei die Erkrankung eine Tumorerkrankung, Infektionserkrankung, Hauterkrankung und/oder Erkrankung des Immunsystems ist.

Hierzu 18 Seite(n) Zeichnungen

FIGUR 1: Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugats Novantron-DTPA-HSA

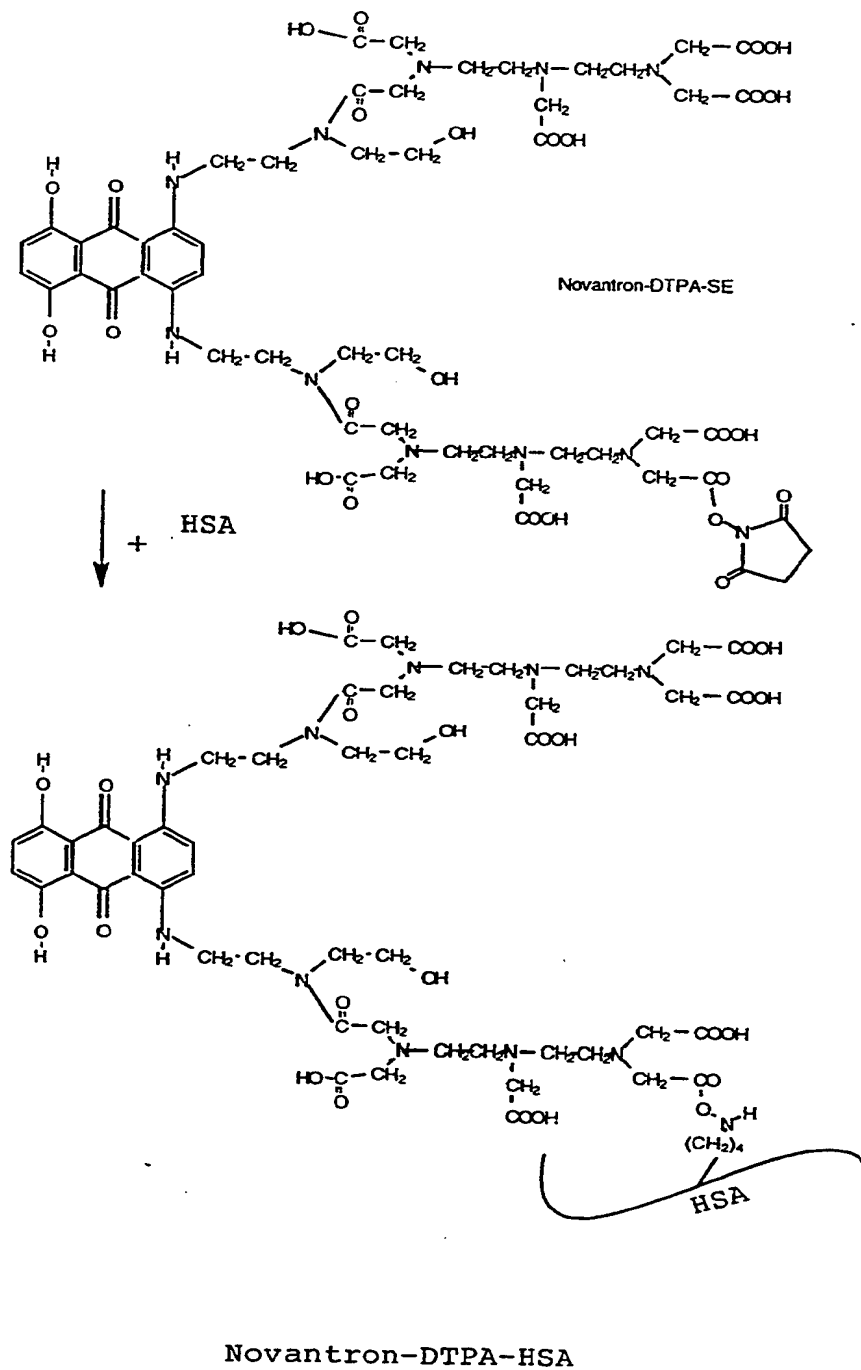


FIGUR 1: (Fortsetzung I)

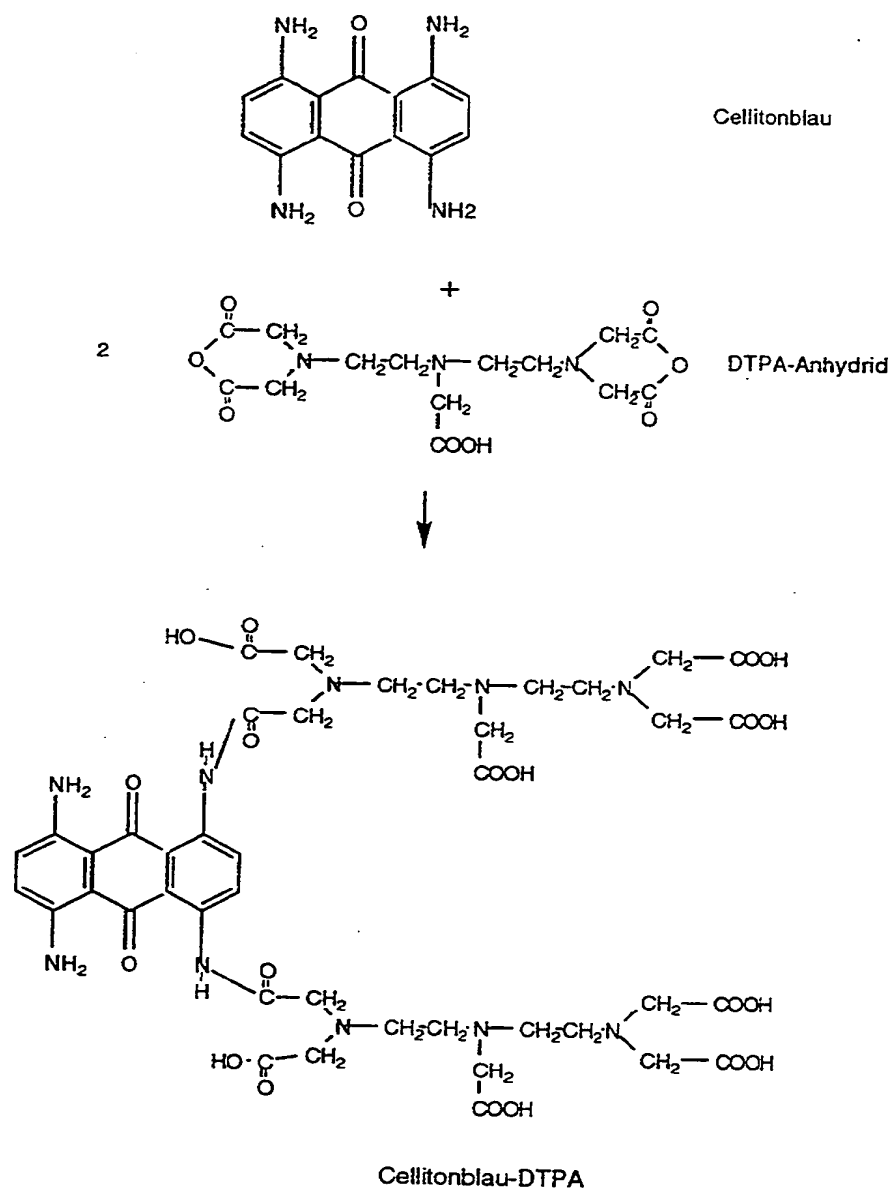


(SE= Succinimidylester)

FIGUR 1: (Fortsetzung II)

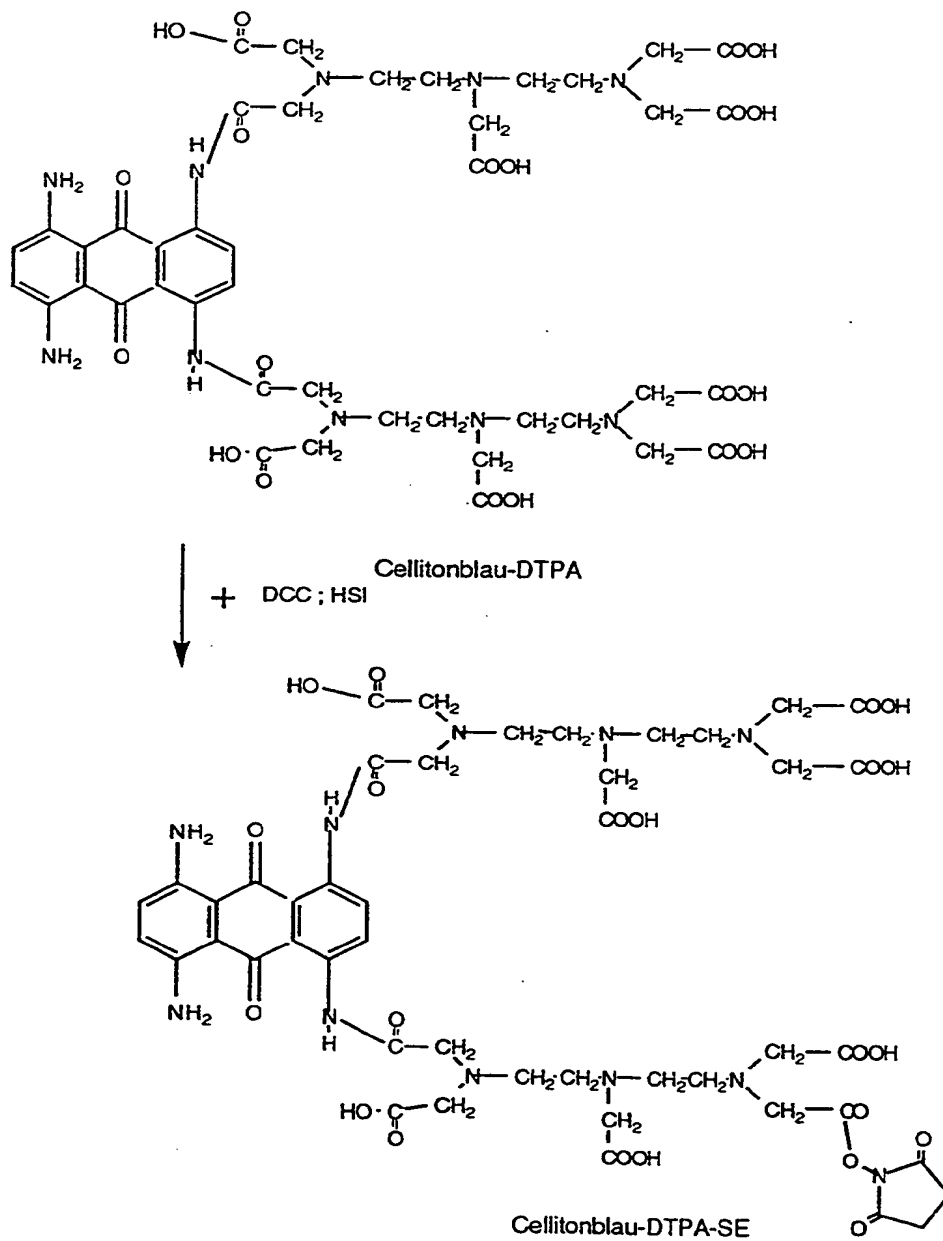


FIGUR 2: Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugats  
Cellitonblau-DTPA-H3A

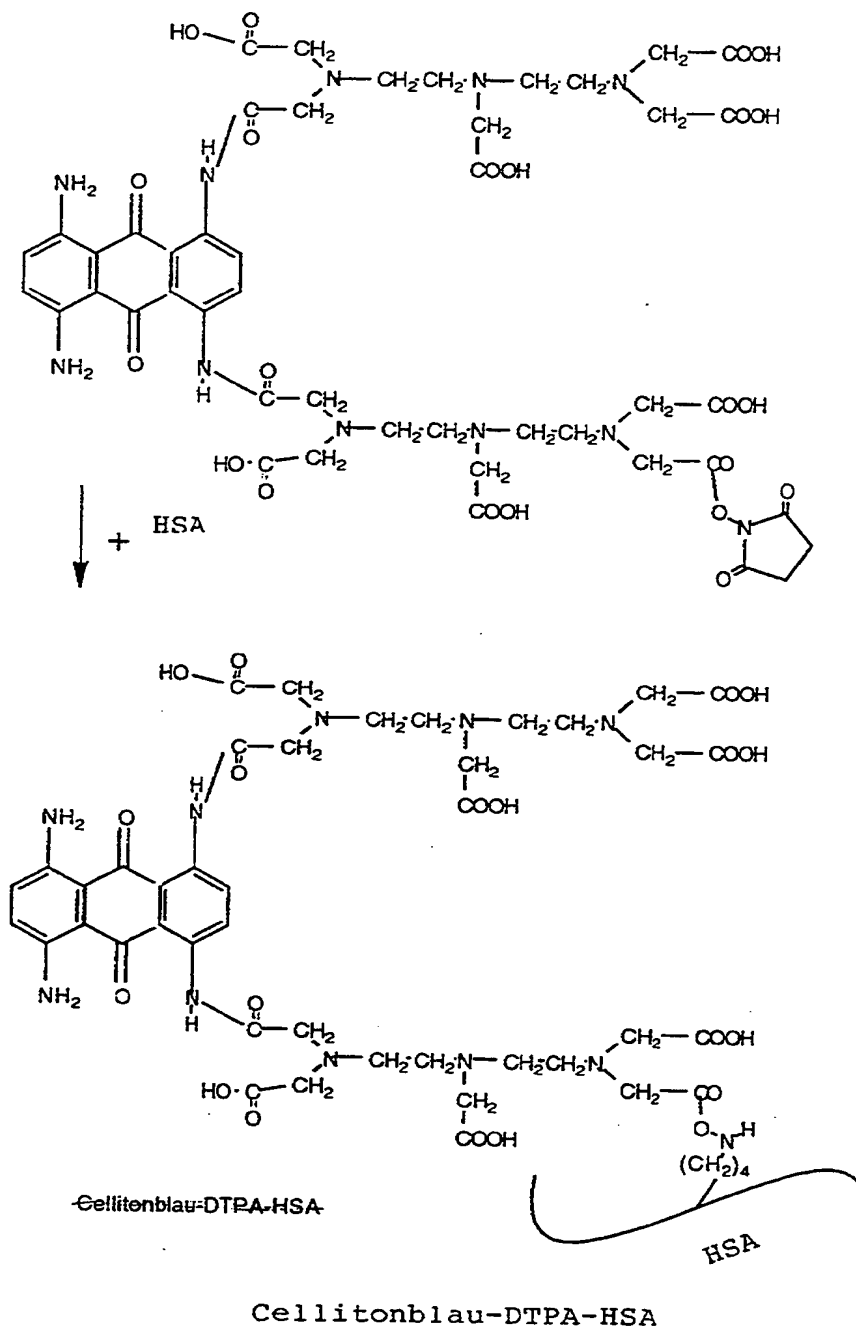




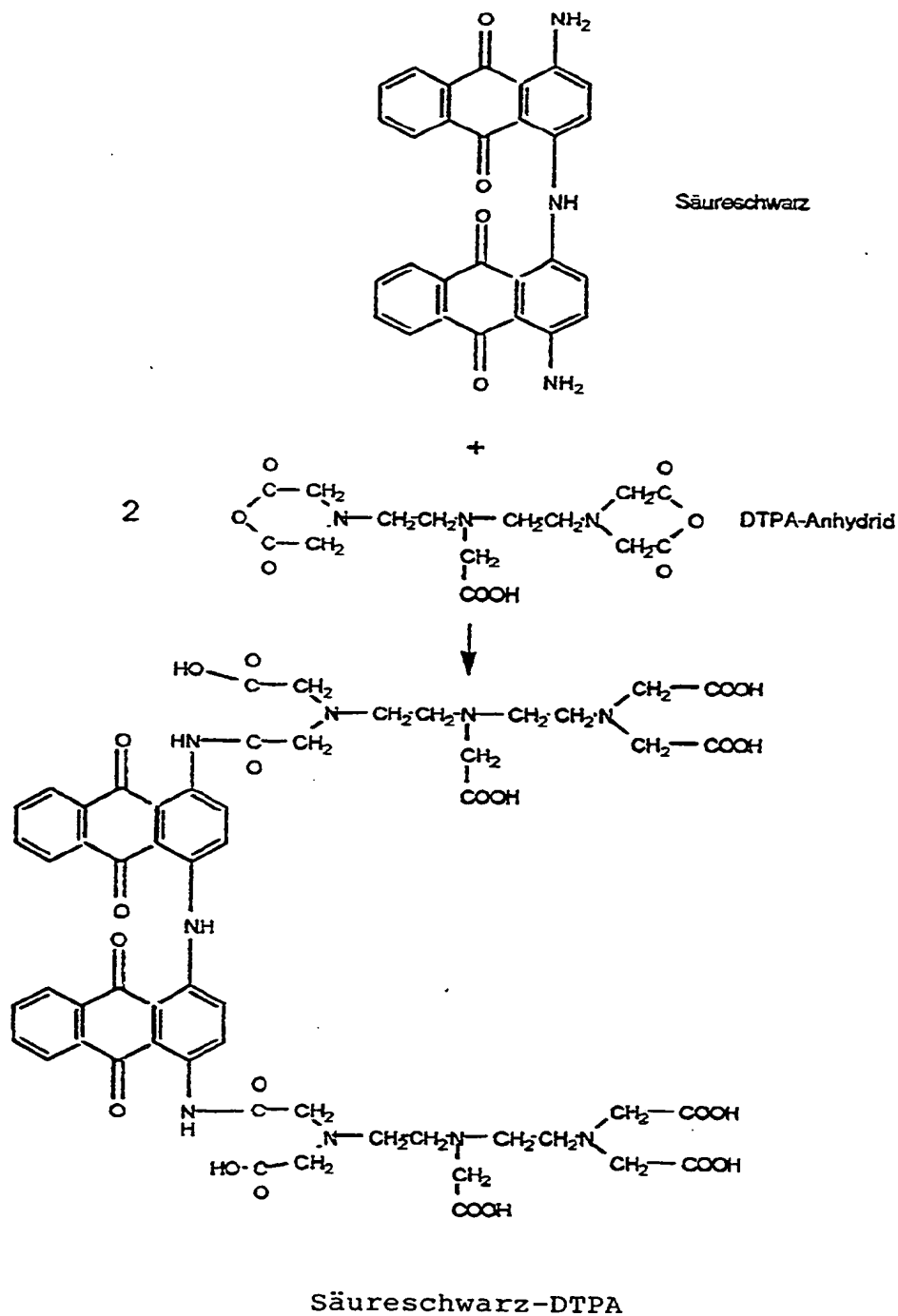
FIGUR 2: (Fortsetzung I)



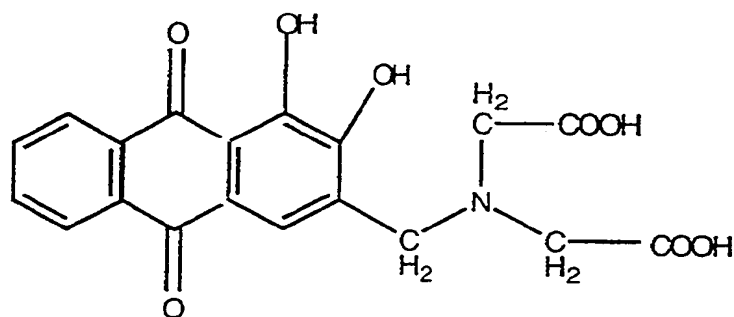
FIGUR 2: (Fortsetzung II)



FIGUR 3: Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugats  
Säureschwarz-DTPA



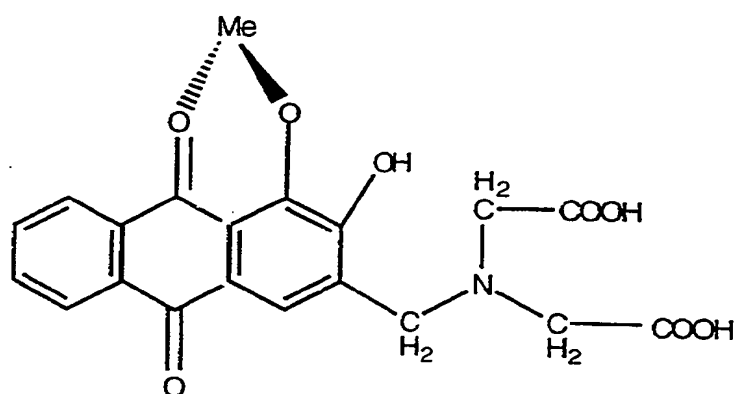
FIGUR 4: Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugats 7-Chlor-tetracyclin-Alizarin-HSA



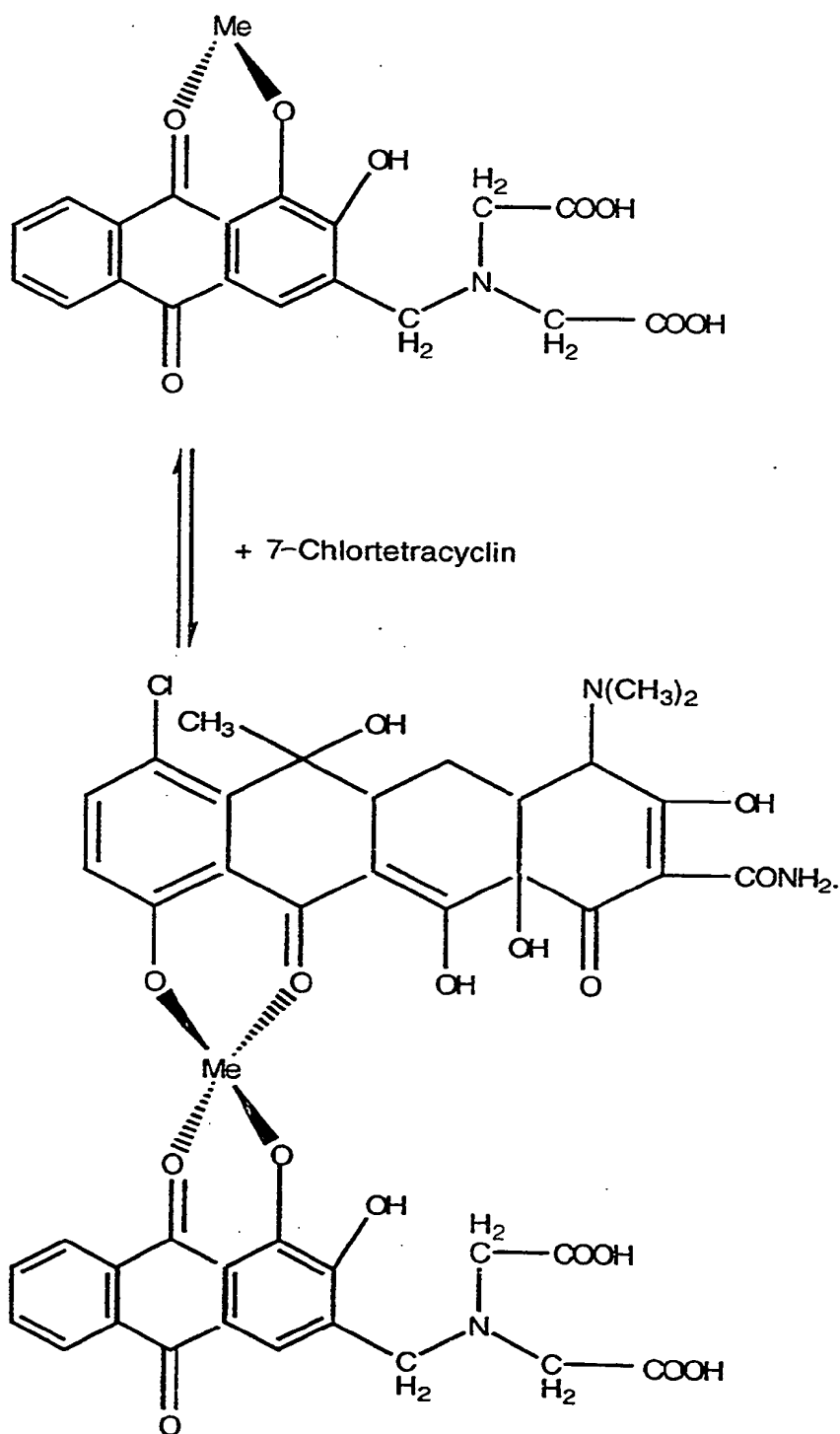
Alizarin-HSA



+ Me<sup>2+</sup> (Cu, Co, Ni, Zn )



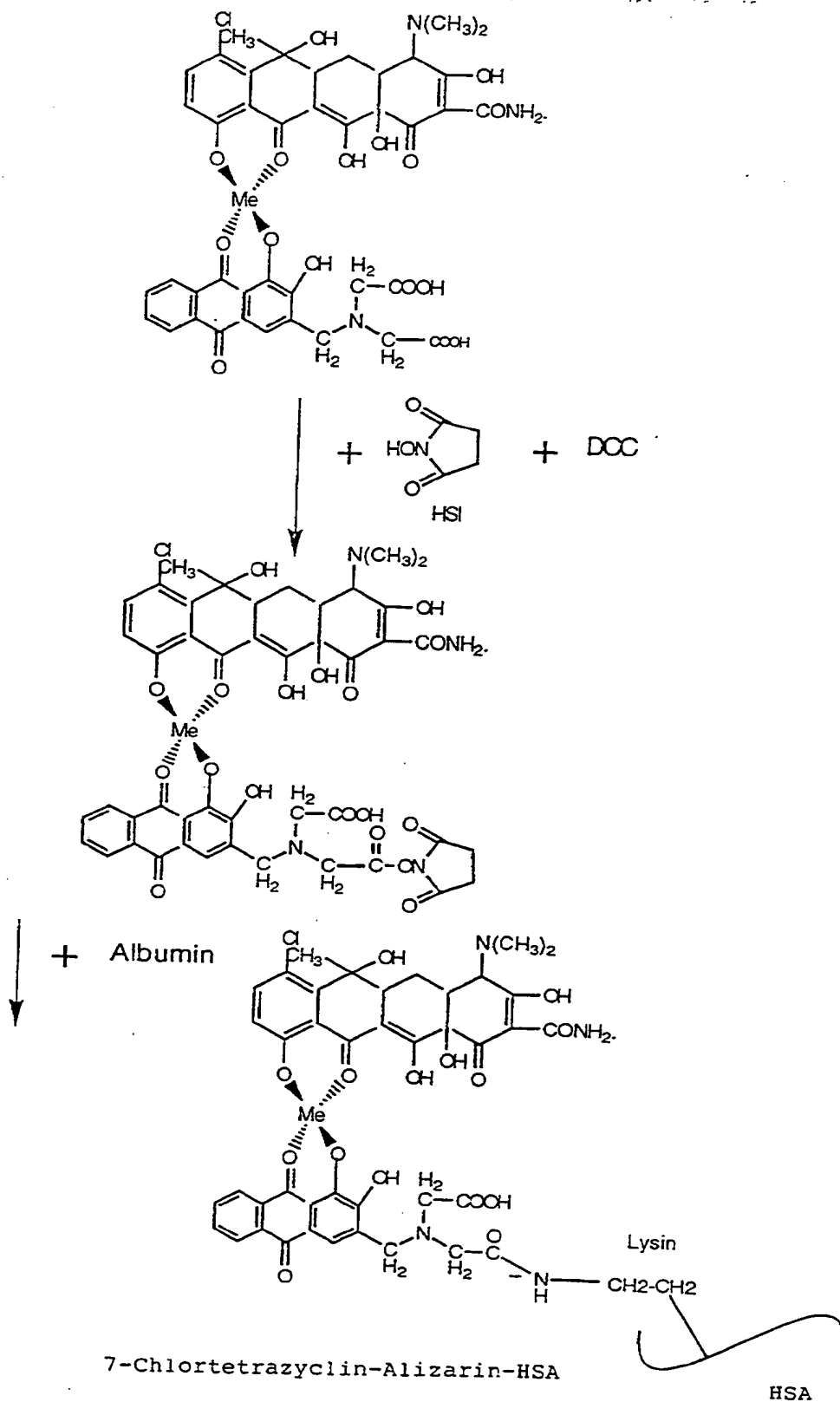
FIGUR 4 (Fortsetzung I)



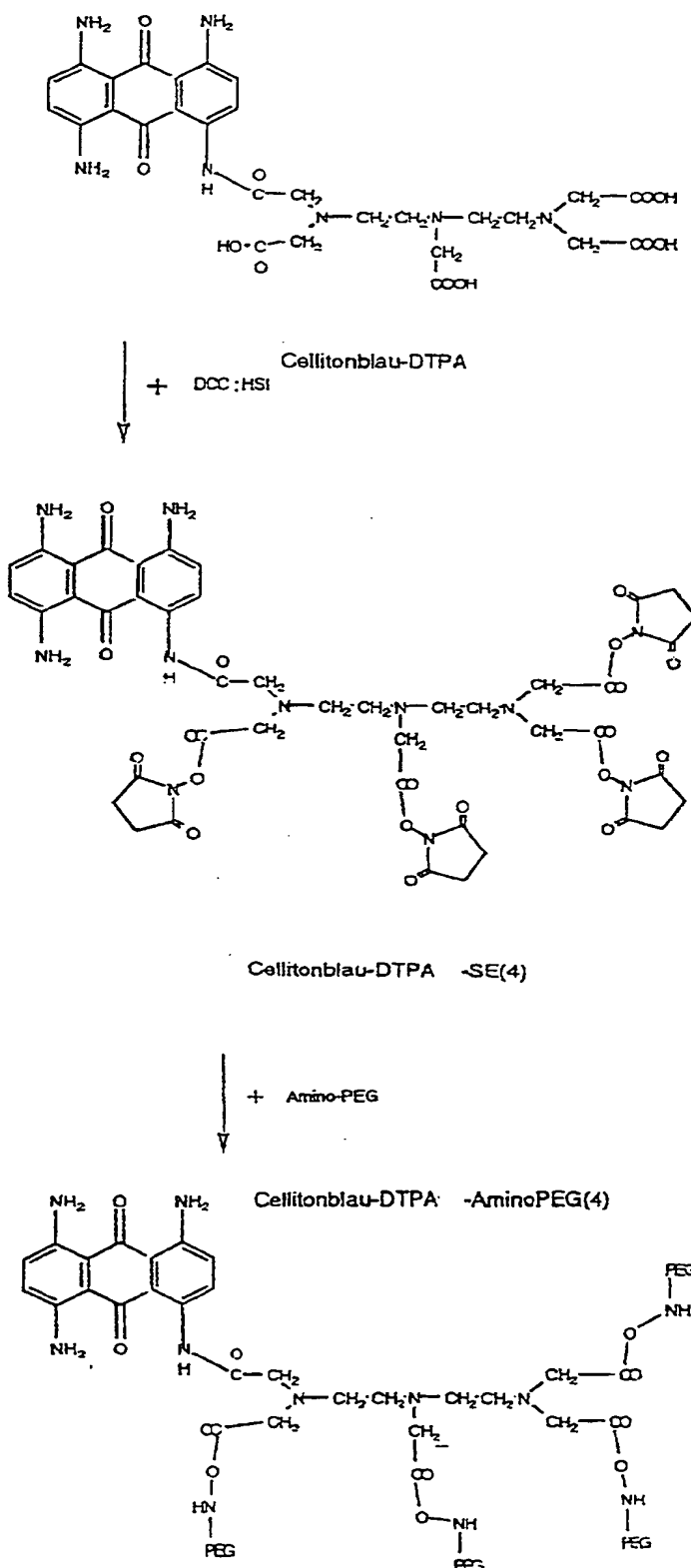
Alizarin-7-Chlortetracyclinkomplex

602 034/586

FIGUR 4: (Fortsetzung I-I)

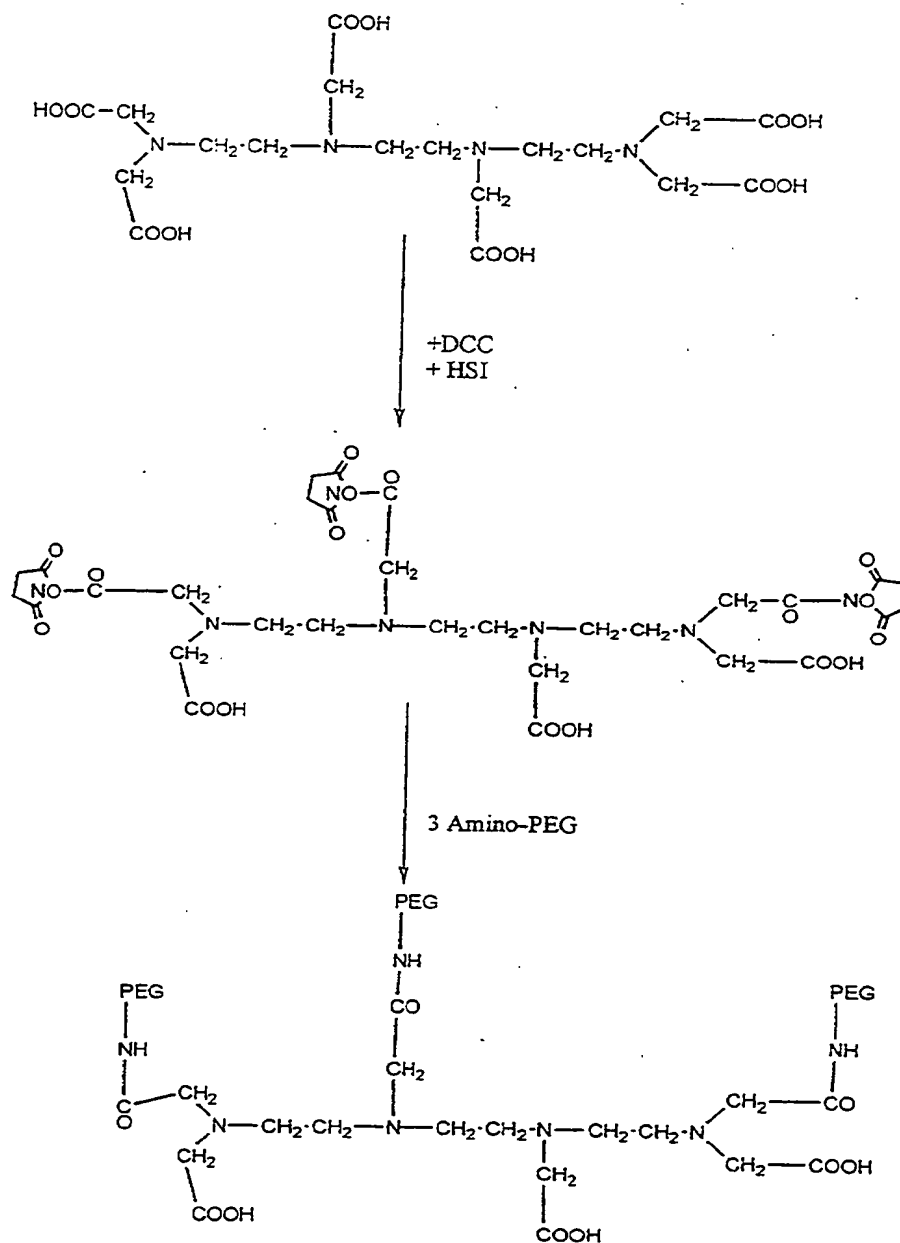


FIGUR 5: Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugats  
Cellitonblau-DTPA-PEG



FIGUR 6: Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugats  
TTHE-PEG(3)-Diethylentriamin(3)-DTPA/Gd<sup>3+</sup>

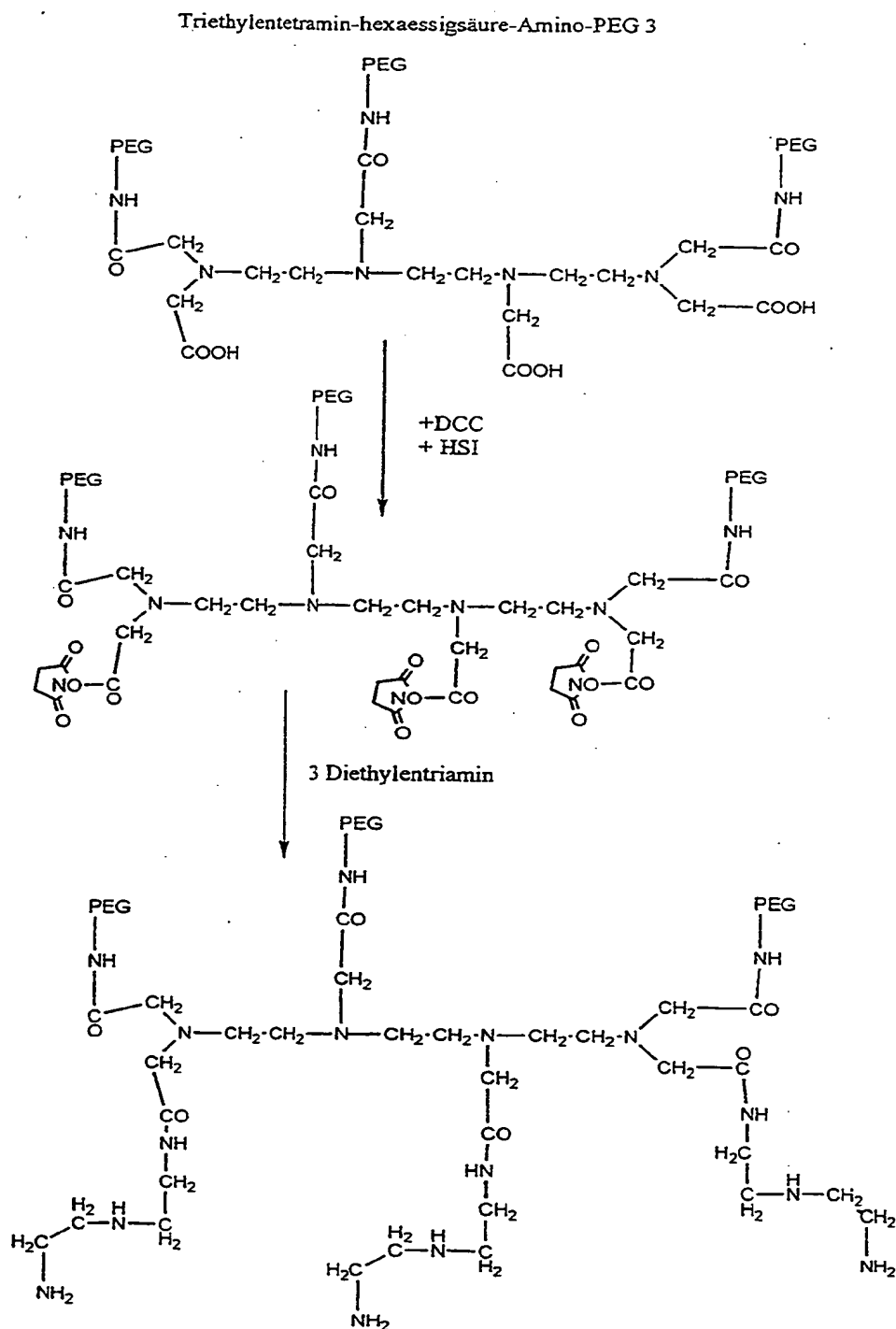
Triethylentetraminhexaessigsäure wird mit 3 Amino-PEGs derivatisiert



Triethylentetramin-hexaessigsäure-Amino-PEG 3

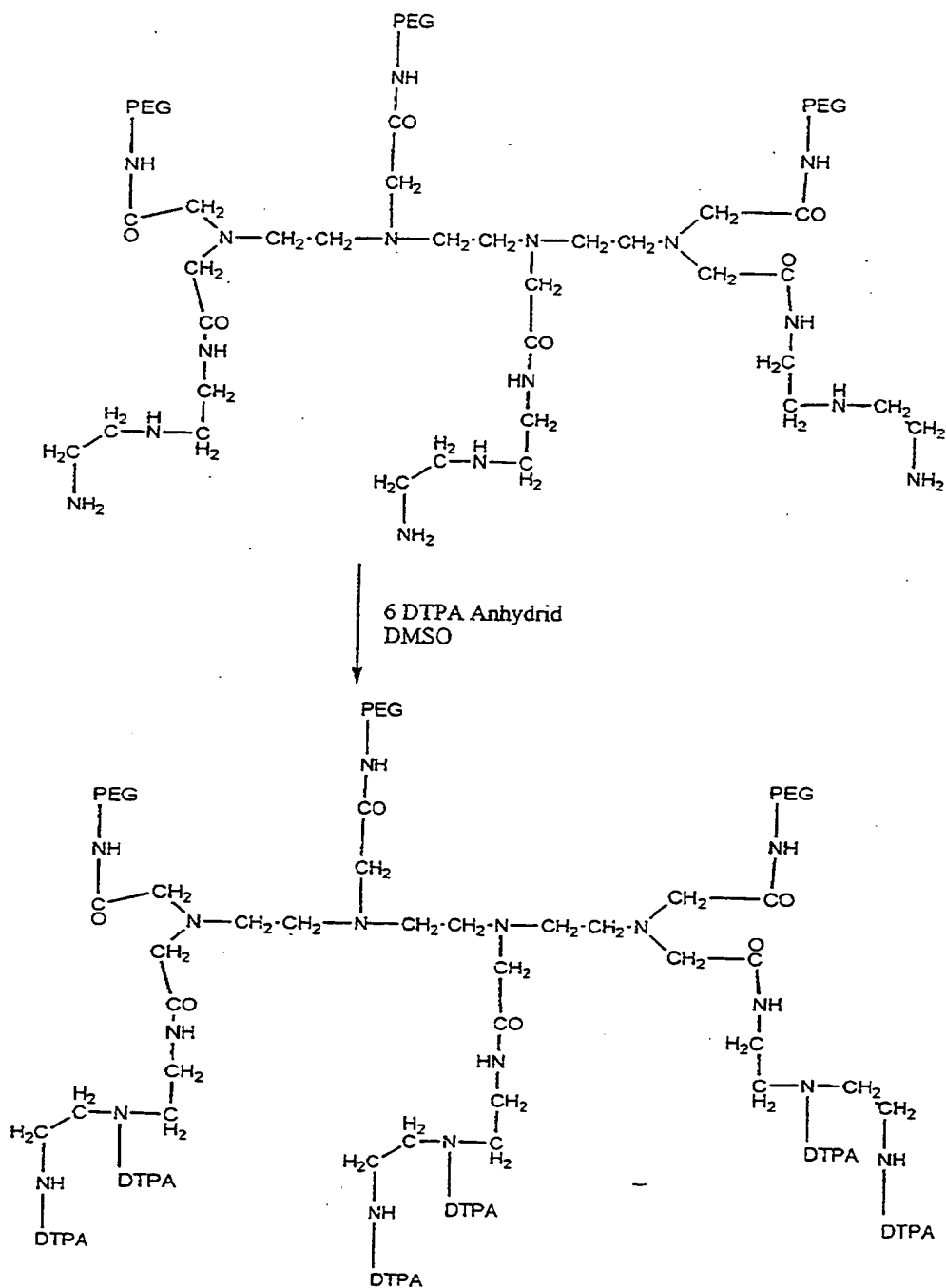


FIGUR 6: (Fortsetzung I)



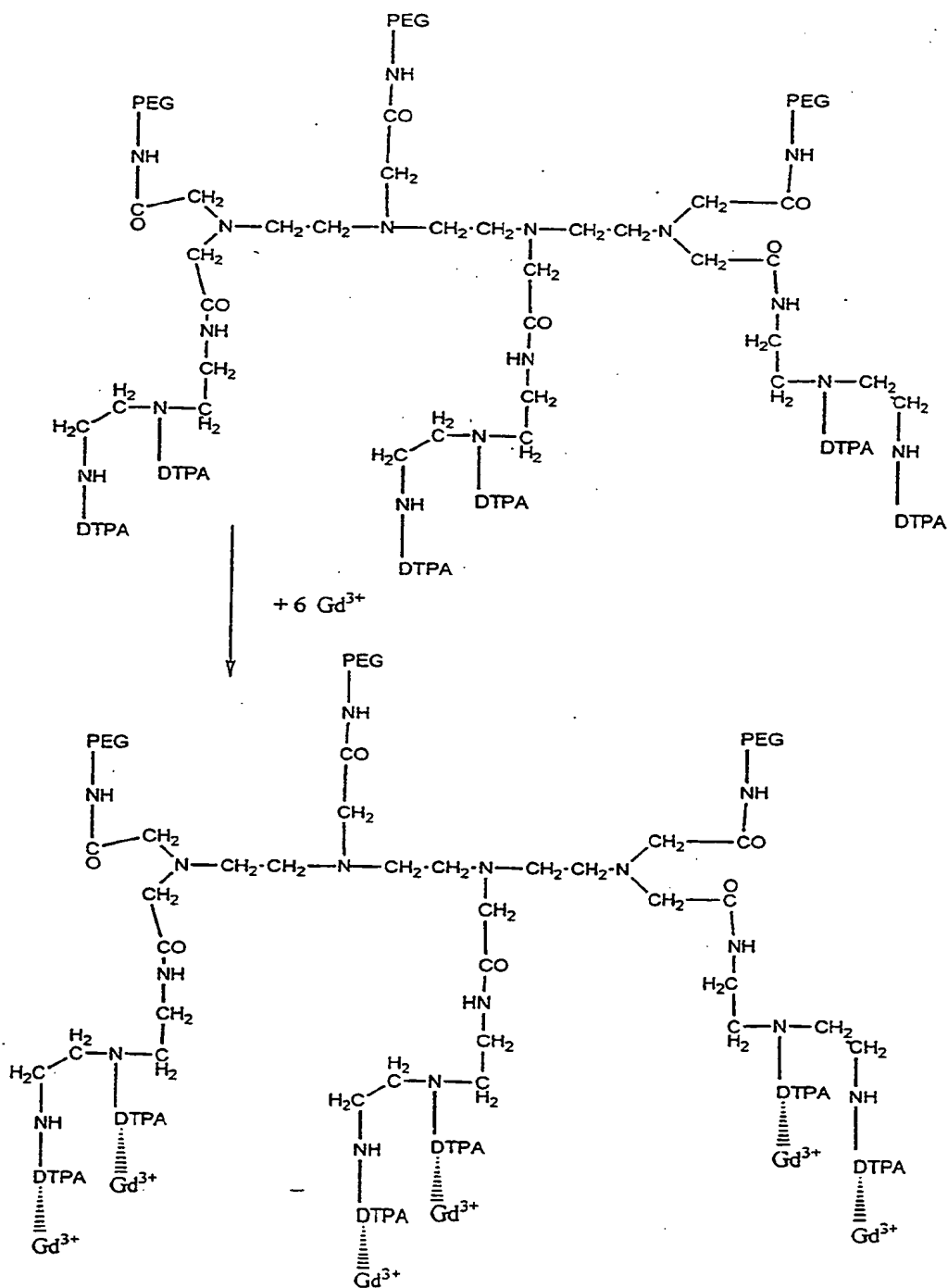
FIGUR 6: (Fortsetzung II)

Kopplung von DTPA an die freien Aminogruppen

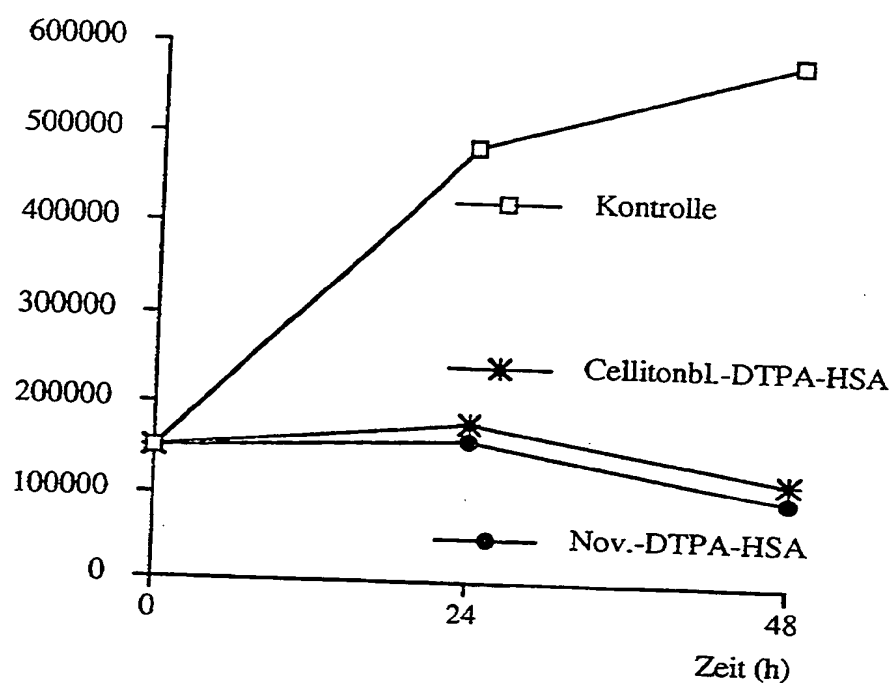


FIGUR 6: (Fortsetzung III)

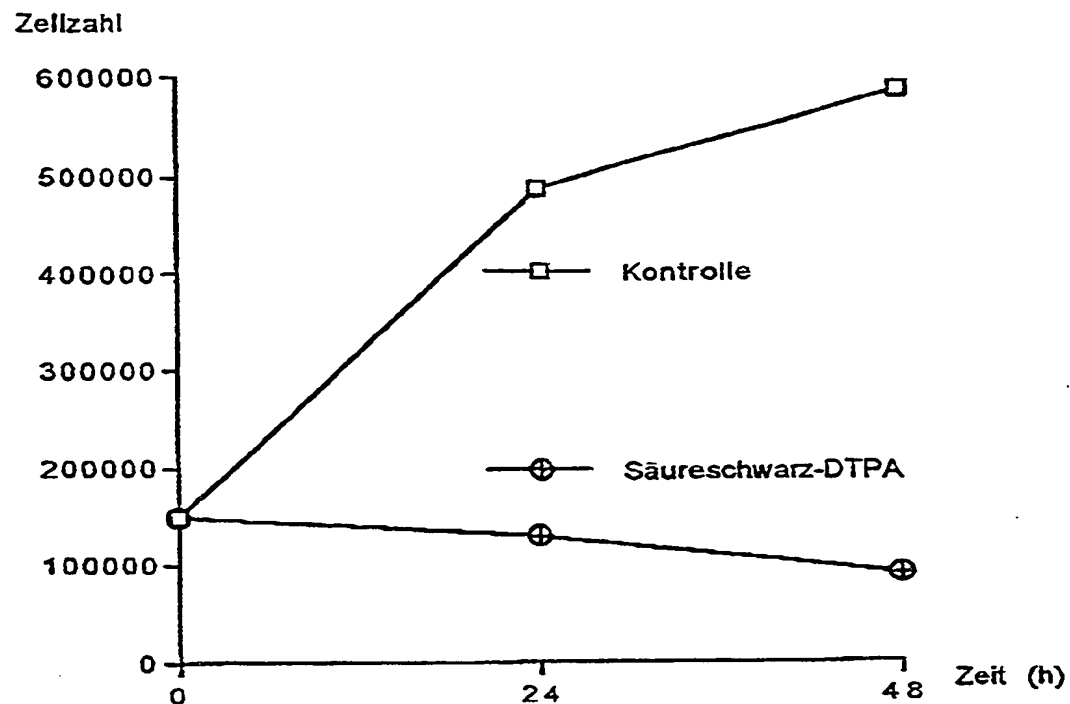
Triethylentetraminhexaessigsäure (AminoPEG 3) (Diethylentriamin-3) (DTPA 6)



FIGUR 7: Wachstumsinhibition von Tumorzellen durch  
Verabreichung von Cellitonblau-DTPA-HSA bzw.  
Novantron-DTPA-HSA



FIGUR 8: Wachstumsinhibition von Tumorzellen durch Verabreichung von Säureschwarz-DTPA



FIGUR 9: Verteilung von  $^{111}\text{In}$ -Novantron  
DTPA-HSA über der Tumor-, Herz- und Leberregion.

